

AK

## TARGETED DELIVERY VIA BIODEGRADABLE POLYMERS

Patent number: JP10509696T

Publication date: 1998-09-22

Inventor:

Applicant:

Classification:

- international: A61K9/00; A61K9/127; A61K9/00; A61K9/127; (IPC1-7): A61K9/127; A61K9/16; A61K9/50

- european: A61K9/00M4; A61K9/127

Application number: JP19950513488T 19951011

Priority number(s): WO1995US14103 19951011; US19940322092 19941012

BEST AVAILABLE COPY

Also published as:



WO9611671 (A1)

EP0785774 (A1)

EP0785774 (B1)

AU700903 (B2)

Report a data error here

Abstract not available for JP10509696T

Abstract of corresponding document: WO9611671

Delivery of bioactive molecules such as nucleic acid molecules encoding a protein can be significantly enhanced by immobilization of the bioactive molecule in a polymeric material adjacent to the cells where delivery is desired, where the bioactive molecule is encapsulated in a vehicle such as liposomes which facilitates transfer of the bioactive molecules into the targeted tissue. Targeting of the bioactive molecules can also be achieved by selection of an encapsulating medium of an appropriate size whereby the medium serves to deliver the molecules to a particular target. For example, encapsulation of nucleic acid molecules or biologically active proteins within biodegradable, biocompatible polymeric microparticles which are appropriately sized to infiltrate, but remain trapped within, the capillary beds and alveoli of the lungs can be used for targeted delivery to these regions of the body following administration to a patient by infusion or injection.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-509696

(43) 公表日 平成10年(1998) 9月22日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	F I		
A 6 1 K	9/127	A 6 1 K	9/127	A
	9/16		9/16	A
	9/50		9/50	A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 33 頁)				
(21) 出願番号	特願平8-513488	(71) 出願人	フォーカル, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02173, レキシントン, マギヤー ロード 4	
(86) (22) 出願日	平成7年(1995)10月11日	(72) 発明者	ロス, ローレンス エイ. アメリカ合衆国 ニューハンプシャー 03087, ウィンダム, ジャックマン リッジ ロード 8	
(85) 翻訳文提出日	平成9年(1997)4月14日	(72) 発明者	ハーマン, スティーブン ジャック アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01810, アンドバー, サマー ストリート 28	
(86) 国際出願番号	PCT/US 95/14103	(74) 代理人	弁理士 山本 秀策	
(87) 国際公開番号	WO 96/11671			
(87) 国際公開日	平成8年(1996)4月25日			
(31) 優先権主張番号	322, 092			
(32) 優先日	1994年10月12日			
(33) 優先権主張国	米国 (US)			
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP			

(54) 【発明の名称】 生分解性ポリマーを介する標的化送達

## (57) 【要約】

タンパク質をコードする生体活性分子 (例えば、核酸分子) の送達は、ポリマー物質中の生体活性分子を送達が所望される細胞の近傍に固定化することにより顕著に増強され得る。ここで、上記生体活性分子は、標的化組織への生体活性分子の伝達を容易にするビヒクル (例えば、リポソーム) 中にカプセル化される。生体活性分子の標的化はまた、適切なサイズのカプセル化媒体の選択により達成され得、それにより、媒体は分子を特定の標的に送達するのに役立つ。例えば、核酸分子または生物学的活性タンパク質の、適切なサイズにされて毛細血管床および肺胞内に浸透するが、その中にトラップされたままである生分解性の生体適合性ポリマーマイクロパーティクル中へのカプセル化は、注入または注射による患者への投与後に、身体のこれらの領域への標的化送達に使用され得る。

**【特許請求の範囲】**

1. 細胞および組織への生物学的活性分子の標的化局所送達方法であって、以下の工程：

生分解性マイクロパーティクルを選択する工程であって、該生分解性マイクロパーティクルが、生物学的活性分子を含み、そして動物へ該マイクロパーティクルを投与する際に、該動物の処置が必要な少なくとも1つの標的化遠位部位に該マイクロパーティクルが留まるような直径を有する、工程；および

該マイクロパーティクルを該動物に投与する工程であって、それにより、放出が所望される身体内の標的化遠位部位で治療的に有効量の該生物学的活性分子の放出を制御するに十分な時間、該標的化部位に該マイクロパーティクルを留めさせる、工程、  
を包含する方法。

2. 前記マイクロパーティクルが、1～100ミクロンの直径を有し、そして領域または器官に投与され、該領域または器官内の遠位の位置に留まるかまたは付着する、請求項1に記載の方法。

3. 前記マイクロパーティクルが、1～100ミクロンの直径を有し、そして循環に投与され、そして閉塞が起こる少なくとも1つの部位、または該マイクロパーティクルが選択的に留まる領域にトラップされた後、前記生物学的活性分子を放出する、請求項1に記載の方法。

4. 前記マイクロパーティクルが、リポソームの形態である、請求項1に記載の方法。

5. 細胞および組織への生物学的活性分子の標的化局所送達のための薬剤の製造における生分解性マイクロパーティクルの使用であって、該マイクロパーティクルが生物学的活性分子を含み、そして動物へ該マイクロパーティクルを投与する

際に、該動物の処置が必要な少なくとも1つの標的化遠位部位に、該標的化部位で治療的に有効量の該生物学的活性分子の放出を制御するに十分な時間、該マイクロパーティクルが留まるような直径を有する、使用。

6. 前記マイクロパーティクルが、1～100ミクロンの直径を有する、請求項5

に記載の使用。

7. 前記生物学的活性分子が、タンパク質、核酸分子、炭水化物、脂質、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

8. 前記タンパク質が、増殖因子、血管新生因子、サイトカイン、および免疫抑制剤からなる群から選択される、請求項7に記載の方法。

9. 前記増殖因子が血管内皮増殖因子である、組織の血管新生または血管再生を促進するための、請求項8に記載の方法。

10. 前記マイクロパーティクルが、静脈内、筋肉内、皮下、直接洗浄およびエアロゾル投与からなる群から選択される投与経路により、薬学的に受容可能なキャリア中で投与される、請求項1に記載の方法。

11. 前記マイクロパーティクルが、静脈内投与される、請求項1に記載の方法。

12. 前記マイクロパーティクルが、血管内投与される、請求項1に記載の方法。

13. 前記生物学的活性分子が、送達可能な増殖因子を含む、請求項1に記載の方法。

14. 前記生物学的活性分子が、送達可能な増殖因子を含む、請求項5に記載の使用。

15. 前記生物学的活性分子が、タンパク質、核酸分子、炭水化物、脂質、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項5に記載の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 生分解性ポリマーを介する標的化送達

## 発明の背景

本発明は概して、薬物送達および遺伝子治療デバイスの分野にあり、そしてより具体的には薬物の送達および、ポリマーマトリックス中のリポソームを包含するポリーマイクロパーティクルを介する遺伝子移入の分野にある。

種々の物質が、薬物、核酸、および生物物質 (biologics) の送達のために開発されている。例は、生分解性ポリマーまたは非生分解性ポリマーから形成されるマイクロスフェア、マイクロカプセル、およびマイクロパーティクルを包含し、これらは取り込まれる物質を経時的にまたは特定の条件への曝露の後に放出する。標的化される部位での直接的な投与を介する以外の物質の標的化は、非常に困難であった。複数の放出部位が必要な場合、大部分は全身的に投与される。

より最近では、ポリマーゲルまたはフィルムが、特にアンチセンスのような小さいオリゴヌクレオチドの薬物送達および遺伝子治療のために利用されている。リポソームもまた、遺伝子物質の送達のために利用されているが、主にリポソームの本質的な不安定性および短い半減期のために、成功の程度は様々である。

遺伝子治療は代表的には、特定の内因性遺伝子の発現を制御する核酸分子の送達、または外因性遺伝子（これは欠損または消失した内因性遺伝子に加えてまたはその代わりに機能する）の送達および発現に適応するために使用される。

3つの方法が、遺伝子治療のための主な機構として開発されている：カチオン性脂質（例えば、リポソームまたは小胞の形態にある）、分子結合体 (molecular conjugate)、および組換えウイルスベクターを介する送達。これらの方法は最近、Morgan, Ann. Rev. Biochem., 62:191(1993)、Mulligan, Science 260:926(1993)、およびTolstoshev, Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 32:573(1993)により概説された。

遺伝子の形質導入方法のこれら3つの主な群は比較的効率的であるが、インビボにおいて形質導入され得る標的化細胞の割合は、比較的低いままである。より

高い割合の遺伝子の形質導入を必要とする症状を処置するためには、形質導入さ

れる細胞の割合を増加させるための新たな技術が非常に有用となる。

さらに、局所投与を介してまたは特定の型の細胞（例えば、複製している細胞）のみに感染するウイルスベクターの選択を介して以外で、遺伝子の送達のために細胞を標的化することは、非常に困難である。局所送達は、有効な局所的な濃度が、全身投与により通常達成され得るよりもずっと高く、一方、全身的な濃度は非常に低いままであり、その結果、重篤な副作用を回避し得るという点で、有利性を有する。しかし、身体中の分散した領域を標的化して、全身的な関与なしに局所的な放出を達成することを可能にする利用可能な方法はほとんど存在しない。

血管壁において組換え遺伝子を発現させる能力が、血管疾患の遺伝子治療のための期待を起こした。血管壁への遺伝子の導入に対する2つの一般的なアプローチが研究された。1つのアプローチ（直接遺伝子移入という）においては、標的細胞をまず単離し、そして遺伝子移入をインビトロにおいて達成し；次いで、組換え遺伝子産物を発現する細胞を選択し、そして宿主の血管壁中に移植する。第2のアプローチにおいては、遺伝子を「インサイチュ」で血管壁内の細胞に送達する；この直接的なインビボにおける遺伝子の送達へのアプローチは、治療の様式 (therapeutic modality) として魅力的である。なぜなら、このアプローチは患者から血管細胞を取り出す必要を軽減するからである。しかし、直接遺伝子移入は陽性のトランスフェクタントについて選択する機会を排除するので、適切な量のDNAが導入され、そして標的組織により発現されることが必須である。血管平滑筋細胞が、直接遺伝子移入アプローチのための適切な標的であり得る。なぜなら、血管平滑筋細胞は、管腔表面に近く、そして血管壁において豊富であるからである。さらに、平滑筋細胞の異常な蓄積は、アテローム性動脈硬化および特定の促進された型の血管疾患（例えば、バルーン血管形成術後の再狭窄）の特徴である。

血管壁内の平滑筋細胞をトランスフェクトする1つの可能な手段は、カチオン性リポソームの使用を介する。リポソーム媒介性遺伝子移入は、組換えDNAの細胞への移入の便利な方法であり、そして生存する動物の動脈壁を直接的にトラン

スフェクトするために使用されている。しかし、カチオン性リポソームを用いて成功する遺伝子移入の効率は変化し、そして細胞型に高度に依存する。現在までの大部分のインビトロにおける経験は、連続的／不死動物細胞株を用いていた。しかし、これらの型の細胞を用いて研究された結果は、患者における直接動脈遺伝子移入の成功の可能性についての、不確かな暗示を与える。

増殖因子の局所送達、いくつかの方法で試みられている。Takeshitaら、J. Clin. Invest., 93:662-670, (1994)は、ウサギに増殖因子VEGFのための形質転換ベクターのポーラスを送達した。不運なことに、送達は局所的領域に限定されなかった。米国特許第5,238,470号Nabelらは、ダブルバルーンカテーテルを介する動脈への形質転換ベクターの投与を開示する。この方法に対する主な制限は、遺伝子物質がすべて1回で投与され、非効率的な形質導入を生じることである。さらなる制限は、Nabelが実質的な点滴注入時間（約30分）を必要とし、延長された動脈遮断を生じることである。

それゆえ、核酸分子およびその他の薬物、または生物活性分子 (bioactive molecule) のための改善された、特異的な送達手段の必要が存在する。

それゆえ、本発明の目的は、生物活性分子、特に核酸分子の、患者中の組織または細胞への標的化送達のための方法および手段を提供することである。

本発明のさらなる目的は、生物活性分子をプロテアーゼおよびヌクレアーゼから保護する送達手段を提供することである。

本発明のなおさらなる目的は、生物活性分子の、患者中の組織または細胞への、制御された持続性の様式での局所投与のための手段を提供することである。

#### 発明の要旨

タンパク質をコードする核酸分子のような生物活性分子の送達は、送達が所望される細胞に隣接したポリマー物質中の生物活性物質の固定化により顕著に増強され得る。ここで生物活性分子は、生物活性分子の標的組織への移入を促進する、リポソームのようなビヒクル中にカプセル化される。生物活性分子の標的化はまた、適切なサイズのカプセル化媒体の選択により達成され得る。これにより、この媒体は分子を特定の標的に送達するように作用する。例えば、浸潤はするが

毛細血管床および肺の肺胞内にトラップされたままであるために適切なサイズである、生分解性、生体適合性ポリマーマイクロパーティクル内の、核酸分子または生物学的に活性なタンパク質のカプセル化が、患者への注入または注射による投与の後の、身体のこれらの領域への標的化送達のために使用され得る。

実施例は、ポリマーゲルを介するDNAの送達、およびポリマーゲル中に固定化されたりポソーム内にカプセル化されたDNAの送達を示す。DNAのゲル中の固定化は、送達を約300%増加させる；DNAの浸透増強物質（penetration enhancer）（例えば、リポソーム）中の固定化（これを次いで、ポリマーゲル中に固定化する）は、送達を約600～700%増加させる。これは、ルシフェラーゼ発現およびTurner Light単位の検出に基づいて測定される。

#### 発明の詳細な説明

生物学的活性分子の標的化された、増強された送達は、この分子の特定の領域への標的化のためのポリマーキャリアの使用により増強される。1つの実施態様において、ポリマーキャリアは、生物活性分子を放出部位に固定化するように作用するヒドロゲルである。別の実施態様において、ポリマーキャリアは、サイズ特性および分解特性ならびに、身体の特定の領域（特に肺胞および毛細血管）への放出特性により標的化されるマイクロパーティクルの形態にある。

#### ポリマーキャリア

##### ポリマー物質の選択

ポリマーキャリアは、生分解性であり、生物学的活性分子の流出を可能にするために十分に多孔性であり、そして炎症応答が生物学的活性分子の組織への送達を妨げないように十分に非炎症性かつ生体適合性でなければならない。キャリアがまた、生物学的活性分子のプロテアーゼおよびヌクレアーゼの悪影響からの少なくとも部分的な保護を提供するのであれば、有利である。さらに、ポリマーキャリアを使用して制御された、持続性の送達を得ることができれば、有利である。

。

多数のポリマーを、キャリアを形成するために利用し得る。それらは、ヒドロゲル、オルガノゲル、フィルム、またはマイクロパーティクルであり得る。マイクロパーティクルは、マイクロスフェア、マイクロカプセル、および本明細書に



において用いられるリポソームを包含し、これらはさらにポリマーマトリックス内にカプセル化され得る。ポリマーマトリックスは特定の部位でマイクロパーティクルを固定化し、カプセル化された生物学的活性分子の標的化された送達を増強するように作用する。

使用され得る適切なポリマーは、可溶性および不溶性、生分解性および非生分解性ポリマーを包含する。これらは、ヒドロゲルまたは熱可塑性物質、ホモポリマー、コポリマーまたはブレンド、天然または合成であり得る。

迅速な生物侵食性 (bioerodible) ポリマー (例えば、ポリ[ラクチド-コ-グリコリド]、ポリ無水物、およびポリオルトエステル、これらのカルボキシル基は、それらの平滑な表面が侵食されるときに外部の表面に曝されている) が、薬物送達システムのための優れた候補である。さらに、不安定な結合を有するポリマー (例えば、ポリ無水物およびポリエステル) は、それらの加水分解的反応性について周知である。これらの加水分解的分解速度は、一般にポリマー骨格の簡単な変更により変化され得る。

代表的な天然ポリマーは、タンパク質 (例えば、ゼイン、改変ゼイン、カゼイン、ゼラチン、グルテン、血清アルブミン、またはコラーゲン) および多糖 (例えば、セルロース、デキストラン、ポリヒアルロン酸、アクリル酸エステルおよびメタクリル酸エステルのポリマー、ならびにアルギン酸) を包含する。代表的な合成ポリマーは、ポリホスファジン、ポリ (ビニルアルコール)、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン、ポリアクリルアミド、ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレート、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリビニルハリド、ポリビニルピロリドン、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタン、およびそれらのコポリマーを包含する。合成で改変された天然ポリマーは、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、およびニトリセルロースを包含する。その他の目的のポリマーは、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、セルロースアセテート、セルロースプロピオネート、セルロースアセテートブチレート、セルロースアセテートフタ

レ

ート、カルボキシメチルセルロース、セルローストリアセテート、セルロースサルフェートナトリウム塩、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（エチルメタクリレート）、ポリ（ブチルメタクリレート）、ポリ（イソブチルメタクリレート）、ポリ（ヘキシルメタクリレート）、ポリ（イソデシルメタクリレート）、ポリ（ラウリルメタクリレート）、ポリ（フェニルメタクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）、ポリ（オクタデシルアクリレート）、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（エチレンオキシド）、ポリ（エチレンテレフタレート）、ポリ（ビニルアセテート）、ポリビニルクロリド、ポリスチレン、ポリビニルピロリドン、およびポリビニルフェノールを包含するが、これらに限定されない。代表的な生物侵食性ポリマーは、ポリラクチド、ポリグリコリドおよびそれらのコポリマー、ポリ（エチレンテレフタレート）、ポリ（酪酸）（poly（butic acid））、ポリ（吉草酸）、ポリ（ラクチド-コ-カプロラクトン）、ポリ[ラクチド-コ-グリコリド]、ポリ無水物、ポリオルトエステル、これらのブレンドおよびコポリマーを包含する。

これらのポリマーは、Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., Polysciences, Warrenton, PA, Aldrich, Milwaukee, WI, Fluka, Ronkonkoma, NY, および BioRad, Richmond, CA, のような供給源から入手し得るか、またはこれらの供給業者から得られたモノマーから標準的な技術を用いて合成し得る。

好ましくは、適切なポリマー組成物は、固有のそして制御可能な生分解性を有し（その結果それらは約1週間から約6ヶ月持続する）；無毒で、有意な有毒モノマーを含まず、そして無毒な成分に分解し；生体適合性であり；送達されるべき物質と化学的に適合性であり、そして活性物質を変性させない傾向にあり；生物学的活性分子の取り込み、および拡散、侵食またはそれらの組み合わせによるポリマーからのそれらのその後の遊離を可能にするために十分に多孔性であり；接着によるかまたは幾何学的要素により（例えば、きっちりと形成されるか、または軟化されそしてその後マイクロパーティクル（これは所望の位置にトラップ

される)に成形または形成されることにより)適用部位に留まり得;最小の侵襲の技術により(例えば、カテーテル、腹腔鏡または内視鏡により)送達され得る。

使用され得るモノマー、マクロマー、およびポリマーの型は以下により詳細に記載される。

### ヒドロゲル

ヒドロゲルは、直接送達のための組織への適用についての、好ましい実施態様である。なぜなら、ヒドロゲルは固有にこれらの所望される特性の大部分を有しているからである。特に好ましいヒドロゲルは、主にポリエチレングリコールからなるゲルである。

これらは、以下に記載するような開始剤を用いる直接光重合により、過酸素(peroxygen)を用いる化学重合により、またはコーティングされるべき組織へ吸着した色素を用いる「界面」光重合により適用され得る。

これらのマクロマーの例は、Hill-Westら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5967-5971, 1994; Obst. & Gynecol. 83:59-64, 1994に記載されるPEG-オリゴラクチル-アクリレートである。適切なエンドキャップの選択は、迅速な光重合およびゲル化を可能にし;アクリレートはいくつかの開始システム(例えば、エオシン色素)を用いて、紫外線または可視光への短時間の曝露により重合され得る。ポリ(エチレングリコール)またはPEGの中心構造単位(コア)は、優れた生体適合性を伴う、その高い親水性および水溶性に基づいて有用である。ポリグリコール酸のような短いポリ( $\alpha$ -ヒドロキシ酸)が、好ましい鎖伸長物である。なぜなら、これはエステル結合の加水分解により無害な代謝物であるグリコール酸に迅速に分解するからである。高度に結晶性のポリグリコール酸は水および大部分の一般的な有機溶媒に不溶性であるが、全体のマクロマーは水溶性であり、そして水溶性の組織流体(tissue fluid)と接触しながら生分解性の網目(network)に迅速にゲル化され得る。このような網目を用いて水溶性の薬物および酵素を混入しそして均質に分散させ得、そしてそれらを制御された速度で送達し得る。その他の好ましい鎖伸長物は、ポリ乳酸、ポリカプロラクトン、ポリオルト

エステル、およびポリ無水物である。ポリペプチドもまた使用され得る。

これらの物質は、特に親水性物質の制御された送達のために、特に有用である。なぜなら、ポリマーの水溶性領域は水のポリマー内に混入された物質への接近を可能にするからである。さらに、物質を有機溶媒に曝すことなしに混入されるべ

き物質を含有するマクロマーを重合することが可能である。放出は、分解の前のポリマーからの物質の拡散により、および／または分解する際のポリマーからの物質の拡散により、ポリマー内の特徴的なポアサイズ（これは架橋間の分子量および架橋密度により制御される）に依存して、生じ得る。混入された物質の不活性化はゲルの固定化および保護的效果により軽減され、そしてその他の制御放出システムに関連するカタストロフィー的破裂効果（catastrophic burst effect）は回避される。混入される物質が酵素である場合、基質がゲルを透過することを可能にするようにゲル比率が選択されれば、この酵素は酵素が混入される間に基質に曝され得る。ポリマーの分解は、末端エステル結合が徐々に加水分解されることにより、インビボにおいて、遊離巨大分子の結果としての制御放出を促進する。

これらのマクロマーの有利性は、それらが水性の環境において迅速に重合され得ることである。従って、正確に配座された、半透過性の、生分解性のフィルムまたは膜は、組織上でインサイチュで形成されて、生分解性バリアとして、生存細胞またはその他の生物学的活性物質のためのキャリアとして、および手術用接着剤として作用し得る。特に好ましい実施態様において、マクロマーはそれに結合した光開始剤を有する組織に適用され、そして重合して超薄コーティングを形成する。これは、（再狭窄に関する懸念が存在する）血管のような組織管腔の内部でのコーティングの形成において、およびそれによって接着を形成から防止する手術の間の組織バリアの形成において特に有用である。

一般的な用語で、マクロマーは、水溶液、またはほぼ水性の溶液（例えば、添加されたジメチルスルホキシドを含有する水）に可溶性であるポリマーである。これは、生分解性領域（好ましくは、インビボ条件下で加水分解可能である）、

水溶性領域、および少なくとも2つの光重合可能領域を包含する3つの成分を有する。用語「少なくとも実質的に水溶性」は、可溶性が少なくとも約5 g/100ml水溶液であるべきであることを示す。用語「重合可能」は、その領域がマクロマー間結合（例えば、アクリレート型分子の炭素-炭素2重結合）を生じるさらなる共有結合を形成する能力を有することを意味する。このような重合は、最終的にフリーラジカルを生成する特定の色素および化合物の光子吸収から生じるフリー

ラジカル形成により特徴的に開始される。

好ましい実施態様において、ヒドロゲルは、コア、コアの各末端における伸長、および各伸長におけるエンドキャップを含む、生分解性の、重合可能なマクロマーから形成される。コアは親水性ポリマーまたはオリゴマーであり；各伸長は生分解性オリゴマーであり；そして各エンドキャップは、マクロマーを架橋し得るオリゴマー、ダイマーまたはモノマーである。特に好ましい実施態様において、コアは、約400と30,000 Daとの間の分子量の親水性ポリ（エチレングリコール）オリゴマーを包含し；各伸長は、約200と1200 Daとの間の分子量の生分解性ポリ（ $\alpha$ -ヒドロキシ酸）オリゴマーを包含し；そして各エンドキャップは、コポリマー間の架橋および重合をし得る、約50と200 Daとの間の分子量のアクリレート型モノマーまたはオリゴマー（すなわち、炭素-炭素二重結合を含む）を包含する。より具体的には、好ましい実施態様は、約10,000 Daの分子量のポリ（エチレングリコール）オリゴマーからなるコア；約250 Daの分子量のポリ（グリコール酸）オリゴマーからなる伸長；および約100 Daの分子量のアクリレート部分からなるエンドキャップを取り込む。

コア水溶性領域としての使用のために適切な物質の例は、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（エチレンオキシド）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（エチルオキサゾリン）、ポリ（エチレンオキシド）-コポリ（プロピレンオキシド）ブロックコポリマー、多糖または炭水化物（例えば、ヒアルロン酸、デキストラン、ヘパリン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、またはアルギネート）、あるいはタンパク質（例えば、ゼラチン、コラーゲン、アルブミン、またはオバルブミン）である。

生分解性領域は、ポリマーまたはモノマーから、生分解されやすい結合（例えば、エステル結合、ペプチド結合、酸無水（anhydride）結合、オルトエステル結合、およびホスホエステル結合）を用いてポリマーまたはモノマーから構築され得る。

加水分解可能である生分解性成分の例は、グリコリド、ラクチド、 $\epsilon$ -カプロラクトン、その他の $\alpha$ -ヒドロキシ酸のポリマーおよびオリゴマー、および無毒である物質を生じるかまたは体内に通常の代謝物として存在するその他の生物学

的分解性ポリマーである。好ましいポリ（ $\alpha$ -ヒドロキシ酸）は、ポリ（グリコール酸）、ポリ（DL-乳酸）およびポリ（L-乳酸）である。その他の有用な物質は、ポリ（アミノ酸）、ポリ（酸無水物）、ポリ（オルトエステル）、およびポリ（ホスホエステル）を包含する。例えば、ポリ（ $\epsilon$ -カプロラクトン）、ポリ（ $\epsilon$ -カプロラクトン）、ポリ（ $\delta$ -バレロラクトン）、およびポリ（ $\gamma$ -ブチロラクトン）のようなポリラクトンもまた有用である。

重合領域は好ましくは、光開始剤により生成されたフリーラジカルを用いて重合される。光開始剤は好ましくは、可視光放射線または長波長紫外線放射線を用いる。好ましい重合可能領域は、アクリレート、ジアクリレート、オリゴアクリレート、ジメタクリレート、オリゴメタクリレート、またはその他の生物学的に受容可能な光重合可能基である。好ましい、第3級アミンは、トリエタノールアミンである。

有用な光開始剤は、細胞毒性なしに、そして短い時間枠内に（長くて分、好ましくは秒）、マクロマーのフリーラジカル重合を開始する光開始剤である。長波長紫外線光放射線を用いる開始のために好ましい開始剤は、エチルエオシン、2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノン、その他のアセトフェノン誘導体、およびショウノウキノンである。すべての場合において、架橋および重合は、コポリマー間で、例えば、2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノンまたはエチルエオシン（ $10^{-4} \sim 10^{-2}$  mM）とトリエタノールアミン（0.001~0.1 M）との組み合わせのような光活性化フリーラジカル重合開始剤により開始される。

別の実施態様において、プロセスは、少なくとも一時的に、体温に適合性であ

る物質（しかし、これは沈着プロセスの完了後に非適合性にされ得る）（例えば poloxamer<sup>TM</sup>（ポリエチレンオキシド-ポリエチレングリコールブロックコポリマー））を提供することにより実施される。poloxamer<sup>TM</sup>が選択され得、これは室温で液体であり、そして体温で固体である。

#### ペービング (paving) またはフィルム

他の実施態様において、Slepian米国特許第5,231,580号に記載のようなポリマーペービングまたはフィルムが、カテーテル、腹腔鏡、または内視鏡を用いて組織に適用される。好ましいポリマーは、ポリヒドロキシ酸（例えば、ポリ乳酸、

ポリグリコール酸、およびそれらのコポリマー）、ポリカプロラクトン、ポリ無水物、ポリオルトエステル、および移植または縫合に一般的に使用されるその他の物質を包含する。

このプロセスにおいて使用されるべき物質のための基本的な要求は、生体適合性およびインビボにおいて達成され得る条件下で化学的または物理的に再形成（reconfigure）される能力である。このような再形成条件は、好ましくは光重合を包含するが、加熱、冷却、機械的変形（例えば、引き延ばし）、または化学反応（例えば、重合または架橋）を包含し得る。

それらの適合性の状態において、コーティング物質は、広範な形態を示し得る。これらは、ポリマー、モノマー、マクロマーまたはそれらの組み合わせとして存在し得、溶液、懸濁液、または分散物として維持され得る。

#### マイクロパーティクル

好ましい実施態様において、マイクロパーティクルは身体の特定の領域に留まるように選択される直径を有する。器官または領域内に留まるマイクロスフェアの使用は、血流の研究において知られているが（Flaimら、J Pharmacol. Meth. 11:1-39, 1984; Heymannら、Prog. Cardiovasc. Dis. 20:55-79, 1977）、活性物質の送達においては知られていない。例えば、毛細血管中に留まるように選択されるマイクロパーティクルは、代表的には10ミクロンと25ミクロンとの間、最も好ましくは15ミクロンと20ミクロンとの間の直径を有する。多数の方法が任意の特定のサイズ範囲のマイクロパーティクルを調製するために公知である。本発

明の種々の適用において、サイズは0.2ミクロンから100ミクロンまでの範囲であり得る。ゲルマイクロパーティクルのための、または溶融物質製のマイクロパーティクルのための合成方法は公知であり、そしてエマルジョンにおける、噴霧粒 (sprayed drop) における、および分離相における重合方法を包含する。固体物質または予備形成ゲルについての、公知の方法は、湿式または乾式の摩砕法または磨砕法、微粉碎法、エアジェットまたはふるいによる分別法などを包含する。

マイクロパーティクルを、当業者に公知の種々の異なる方法を用いて、異なるポリマーから製造し得る。例示的な方法は、以下に記載の方法を包含する。

ポリ乳酸ブランクマイクロパーティクルが以下の3つの方法を用いて製造され

た：溶媒蒸発法 (E. Mathiowitzら、J. Scanning Microscopy, 4, 329(1990); L. R. Beckら、Fertil. Steril., 31, 545(1979); および S. Benitaら、J. Pharm. Sci., 73, 1721(1984)により記載される)；ホットメルトマイクロカプセル化法 (E. Mathiowitzら、Reactive Polymers, 6, 275(1987)により記載される)、ならびにスプレードライ法。ビスカルボキシフェノキシプロパンおよびセバシン酸から、モル比20:80 P(CPP-SA) (20:80) (Mw 20,000) で作製されたポリ無水物が、ホットメルトマイクロカプセル化法により調製された。ポリ(フマリック-コ-セバシク) (20:80) (Mw 15,000) ブランクマイクロパーティクルをホットメルトマイクロカプセル化法により調製した。ポリスチレンマイクロパーティクルが、溶媒蒸発法により調製された。

ヒドロゲルマイクロパーティクルは、ポリマー溶液を、リザーバーから、微小滴形成デバイスを通して、攪拌されたイオン浴に滴下することにより調製された。アルギネート、キトサン、アルギネート/ポリエチレンイミド (PEI) およびカルボキシメチルセルロース (CMC) についての特異的な条件を表1に列挙する。

a. 溶媒蒸発法。この方法においては、ポリマーを塩化メチレンのような揮発性有機溶媒中に溶解する。薬物 (可溶性であるかまたは微粒子として分散されているかのいずれか) を溶液に添加し、そして混合物をポリ(ビニルアルコール)のような界面活性剤を含有する水溶液中に懸濁する。生じるエマルジョンを、大



部分の有機溶媒が蒸発し、固体のマイクロパーティクルを残すまで攪拌する。いくつかの異なるポリマー濃度を使用した：0.05~0.20 g/ml。この溶液を薬物と混合 (load) し、そして1% (w/v) ポリ (ビニルアルコール) (Sigma) を含有する激しく攪拌される蒸留水200 ml中に懸濁する。4時間の攪拌の後、有機溶媒はポリマーから蒸発し、そして生じるマイクロパーティクルを水で洗浄し、そして凍結乾燥機中で一晚乾燥する。異なるサイズ (1~1000ミクロン) および形態を有するマイクロパーティクルが、この方法により得られ得る。この方法は、ポリエステルおよびポリスチレンのような比較的安定なポリマーのために有用である。

しかし、不安定性ポリマー (例えば、ポリ無水物) は、水の存在のために製造プロセスの間に分解し得る。これらのポリマーについては、以下の2つの方法

(これらは完全に無水の有機溶媒中で実施される) がより有用である。

b. ホットメルトマイクロカプセル化法。この方法においては、ポリマーをまず溶解し、そして次いで50ミクロン未満にふるい分けておいた色素または薬物の固体粒子と混合する。混合物を非混和性溶媒 (シリコンオイルのような) 中に懸濁し、そして、連続的に攪拌しながらポリマーの融点の5℃上まで加熱する。一旦エマルジョンが安定化されると、これをポリマー粒子が固化するまで冷却する。生じるマイクロパーティクルを石油エーテルを用いるデカンテーションにより洗浄して、自由流粉末を得る。1~1000ミクロンの間のサイズを有するマイクロパーティクルがこの方法を用いて得られる。この技術を用いて調製されたスフェアの外部表面は、通常円滑かつ密である。この手順は、ポリエステルおよびポリ無水物からなるマイクロパーティクルを調製するために使用される。しかし、この方法は、1000~50,000の間の分子量を有するポリマーに限定される。

c. 溶媒除去法。この技術は、主にポリ無水物のために設計される。この方法においては、薬物を塩化メチレンのような揮発性有機溶媒中の選択されたポリマーの溶液中に分散または溶解する。この混合物を有機油 (例えばシリコンオイル) 中で攪拌することにより懸濁して、エマルジョンを形成する。溶媒蒸発とは異なり、この方法は、高い融点および異なる分子量を有するポリマーからマイクロ

パーティクルを作製するために使用され得る。1～300ミクロンの間の範囲のマикроパーティクルが、この手順により得られ得る。この技術を用いて生成されたスフェアの外部形態は、使用されるポリマーの型に大きく依存する。

d. スプレードライ法。この方法においては、ポリマーを塩化メチレン中に溶解する (0.04 g/ml)。既知量の活性薬物を、ポリマー溶液中に、懸濁 (不溶性薬物) または同時溶解 (可溶性薬物) する。次いで、この溶液または分散物をスプレードライする。ミニスプレードライヤー (mini-spray drier) (Buchi) のための代表的なプロセスパラメーターは以下のとおりである：ポリマー濃度=0.04 g/mL、入口温度=-24℃、出口温度=13～15℃、アスピレーター設定=15、ポンプ設定=10 mL/分、スプレー流=600 Nl/時、およびノズル直径=0.5 mm。

1～10ミクロンの間の範囲のマикроパーティクルが、使用されるポリマーの型に依存する形態を有して得られる。この方法は、主に、腸管の画像化を改善す

るために設計されたマイクロパーティクルを調製するために使用される。なぜなら、この適用のためには、粒子サイズは10 $\mu$ を越えるべきでないからである。

e. ヒドロゲルマイクロパーティクル法。ゲルタイプポリマーからなるマイクロパーティクル (例えば、アルギネート) は、従来のイオンゲル化技術により作製される。ポリマーをまず水溶液中に溶解し、硫酸バリウムまたはなんらかの生物活性剤と混合し、そして次いで微小滴形成デバイスを通して押し出し、これは場合によっては、小滴を止める (break off) ために窒素ガス流を用いる。ゆっくりと攪拌される (約100～170 RPM) イオン硬化浴を押し出しデバイスの下に設置して形成される微小滴を受ける。マイクロパーティクルを、浴中で20～30分、ゲル化が生じるために十分な時間を可能にするために、インキュベートしたままにする。マイクロパーティクルの粒子サイズは、種々のサイズの押し出し機を用いることにより、または窒素ガスまたはポリマー溶液の流速のいずれかを变化させることにより、制御される。

マトリックスは、好ましくはマイクロスフェアのようなマイクロパーティクル (ここで、生物学的活性分子は固体ポリマーマトリックス中に分散される) またはマイクロカプセル (ここで、生物学的活性分子はポリマーシェルのコア中にカ

プセル化される)の形態にある。ポリマーデバイスのサイズおよび組成は、組織における好ましい放出速度を生じるように選択される。サイズはまた、使用されるべき送達方法に従って選択される。送達方法は、代表的には組織中への注射あるいは懸濁物のエアロゾルによる鼻領域および/または肺領域への投与であり、適切な場合には、放出が所望される部位での混入である。マトリックス組成は、好ましい分解速度を有するようにだけではなく、生体接着性である物質から形成されるように、粘膜表面に投与された場合に移入の有効性をさらに増加させるように選択され得るか、または最初は分解せず、拡散により延長された期間にわたって放出するように選択される。

リポソームは種々の供給業者から市販されている。あるいは、リポソームは、例えば、米国特許第4,522,811号(その全体が参考として本明細書中に援用される)に記載されるように、当業者に公知の方法に従って調製され得る。例えば、リポソーム処方物は、適切な脂質(例えば、ステアロイルホスファチジルエタノール

ールアミン、ステアロイルホスファチジルコリン、アラカドイルホスファチジルコリン、およびコレステロール)を無機溶媒中に溶解し、これを次いで蒸発させ、容器の表面上の乾燥した脂質の薄いフィルムの後ろに置くことにより調製され得る。次いで、活性化合物またはその一リン酸塩、二リン酸塩、および/または三リン酸塩誘導体の水溶液を容器に導入する。次いで、容器を手でゆらして、脂質物質を容器の側面から遊離させ、そして脂質凝集物を分散させ、それによってリポソーム懸濁物を形成させる。

#### 生物学的活性分子

ポリマーキャリアに直接および/または間接的(すなわち、キャリア中に固定化されるマイクロパーティクル内)に取り込まれ得る生物学的活性分子としては、タンパク質、核酸分子、炭水化物、脂質、およびそれらの組み合わせが挙げられる。タンパク質の例としては、サイトカイン(例えば、インターフェロンおよびインターロイキン)、ポエチン(poetin)、およびコロニー刺激因子、増殖因子、血管新生因子ならびにそれらのフラグメントが挙げられる。核酸分子の例としては、タンパク質をコードする遺伝子およびcDNA、発現ベクター、アンチセ

ンスおよび他のオリゴヌクレオチド（例えば、遺伝子発現を調節するか、または防止するために使用され得るリボザイム）が挙げられる。炭水化物としては、セレクトインに対するレセプターに結合して炎症を阻害することが示されている Sialyl Lewis<sup>x</sup> が挙げられる。幅広い意味における増殖因子は、好適な生物学的活性分子である。「送達可能な増殖因子等価体」（DGFEと省略される）は、細胞または組織に対する増殖因子であり、これは、広義に解釈すれば、増殖因子、サイトカイン、インターフェロン、インターロイキン、タンパク質、コロニー刺激因子、ジベレリン、オーキシン、およびビタミンを包含し；さらに上記のペプチドフラグメントまたは他の活性フラグメントを包含し；そしてさらにベクター（すなわち、形質転換または一時的発現のいずれかにより、標的細胞中のこのような因子を合成し得る核酸構築物）を包含し；そしてさらに組織中のこのような因子の合成を刺激するか、または低下させるエフェクター（天然のシグナル分子、アンチセンスおよび3重鎖核酸などを包含する）を包含する。特に好適なDGFEは、血管

内皮増殖因子（VEGF）、内皮細胞増殖因子（ECGF）、塩基性繊維芽細胞増殖因子（bFGF）、骨形態形成タンパク質（BMP）、および血小板由来増殖因子（PDGF）、ならびにそれらをコードするDNAである。好適な凝血溶解剤は、組織プラスミノゲンアクチベーター、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼおよびヘパリンである。

#### ポリマーキャリアへの生物学的活性分子の取り込み

一般に、生物学的活性分子は、物質が重合されるか、あるいはポリマーがマイクロパーティクルまたはリポソーム中に形成される時点のいずれかで、患者の標的化部位で有効量を放出する濃度で、ポリマーと混合される。例えば、ヒドロゲルの場合、マクロマー、光開始剤、およびカプセル化されるべき生物学的活性分子は、水性混合物中で混合される。混合物の粒子は、標準技術を用いて、例えば、オイル中で混合してエマルジョンを形成することにより、ノズルを用いてオイル中で小滴を形成することにより、またはノズルを用いて空気中で小滴を形成することにより、形成される。懸濁液または小滴は、マクロマーの光重合に適切な

光を照射される。

送達されるべき生物学的活性分子は、所望の活性分子の用量に依存して、任意の種々の比でポリマー物質と混合され得る。ゲル中のポリマーは、代表的には、5～25%の体積濃度（重量/体積）、すなわち50～250mg/mlである。生物学的活性体（active）は、DNAなどについては1～10 $\mu$ g/mlまたはそれ以下の濃度で存在し、そして活性タンパク質などについては10～50mg/mlまでの範囲であり得る。正確な濃度は、特定の活性分子、および達成されるべき効果に依存する。

カプセル化特性およびマイクロパーティクルの形態学的特性を調査するための特徴付けの研究は、異なる負荷で実施され得る。粒子サイズは、準弾性的単一散乱（QELS）により測定され得る。薬物負荷は、凍結乾燥したマイクロパーティクルを適切な溶媒に溶解し、そして生物学的活性分子の量を分光光度的にアッセイすることによるか、または他の適切な方法により測定され得る。

#### ポリマーキャリアの投与

ポリマーキャリアは、例えば、溶液の噴霧または塗布により直接的に、あるいはカテーテル、内視鏡、または腹腔鏡を介して間接的に投与され得る。中空器官

の内部に送達する場合、適用プロセスは、器官を介する流動の長期の遮断による側副損傷を引き起こしてはならない。

好適な送達方法は、被検体に対する侵襲性または破壊性が最小である方法である。これらは、マイクロパーティクルの投与、ならびにポリマーコーティング、フィルム、ゲル、またはステントの中空器官の内部または天然体腔への経皮塗布を包含する。組織表面上へポリマーコーティングまたはポリマー層を提供するに適切な送達デバイスは、PathakらによるPCT/US94/94824に定義されるようなカテーテル、腹腔鏡、および内視鏡である。

#### ヒドロゲルの適用

上記のマクロマーを用いるヒドロゲルの光重合は、携帯用低パワー長波UV（LW UV）発光源を用いて10秒間程度実施され得る。可視レーザー光もまた、光重合に有用である。低強度および短時間の曝露により、可視レーザー光を生存細胞に対して実質的に無害にする。なぜなら、放射線は、適切な発色団の非存在下では強

力に吸収されないからである。レーザー光はまた、光ファイバーを用いて輸送され得、そして非常に小さな領域に集中され得る。例えば、0.2mlの30% w/v感光性オリゴマー溶液は、エチルエオシン ( $10^{-4}M$ ) およびトリエタノールアミン (0.01~0.1M) と混合され、そしてこの溶液を、アルゴンイオンレーザー (514nmで発光する American argon ion laser model 905) を用いて0.2~0.5W/cm<sup>2</sup>のパワーで照射する。光線は直径3mmまで拡張され、そしてサンプルはゲル化が起こるまでゆっくりとスキャンされる。

これらの物質の特に好適な適用において、超薄コーティングが組織表面に、最も好ましくは血管のような組織内腔に塗布される。光開始剤が組織表面に塗布され、反応および組織への結合を可能にし、非結合光開始剤が希釈またはリンスにより除去され、そしてマクロマー溶液が塗布され、重合される。この方法により、厚さ10ミクロンと500ミクロンとの間、より代表的には50ミクロンと200ミクロンとの間の均一なポリマーコーティングを作製し得、このコーティングは血栓または限局性炎症を喚起しない。

#### ペービングまたはコーティングの適用

ポリマー物質の局所投与は、組成物をバルーンカテーテルにロードし、次いで

この組成物を、カテーテルのバルーンにより閉塞される区域内的の組織内腔の内側に直接塗布することにより、実施され得る。組織表面は、内部表面または外部表面であり得、そして天然に存在するか、あるいは外科手術、経皮技術、外傷または疾患の結果として生じるかのいずれかの組織内腔の内部または中空空間を含み得る。次いで、ポリマー物質は再形成され、実質的にコーティングまたは「ペービング」層を形成し得、そして表面との接触を適合させる。得られるペービング層は、必要に応じてシーリング機能を有し得る。本明細書で使用される用語「シーリング」または「シール」は、コーティングがバリア機能を提供するように十分に低い多孔性のコーティングを意味する。用語「ペービング」は、一般に、コーティングが多孔または有孔であるか、あるいは低多孔性「シーリング」の変形であるコーティングをいう。コーティングは、好ましくは組織表面上で0.001~1.0mmのオーダーの厚さを有するが、この範囲外の厚さを有するコーティングも同

様に使用され得る。使用する物質およびペービング物質の形状の適切な選択により、プロセスは調整され、広範な種々の生物学的または臨床状況を満足させ得る。

この適用に使用され得るモノマー、マクロマーおよびポリマーは、マイクロパーティクルの形成について上記した群と同一の群から選択される。好ましくは、ポリマー物質は、刺激に応答して、変化し得る程度の適合性を有する。物質は、好ましくは、コーティングプロセスの完了時に、実質的にインビボで非適合性である。その適合性形態において物質は、コーティングされるべき組織または細胞表面と接触して配置され得、次いで刺激されて非適合性になり得る。物質は、好ましくは、光化学刺激の適用により非適合性になるが、必要に応じて単に化学刺激または熱刺激により達成され得る。物質は、内部または外部処置位置のいずれかに配置され、そしてペービングされるか、またはシールされるべき組織または細胞表面と接触し、次いで物質は、非適合性状態に変換され、組織表面上に生体適合性コーティングを形成する。

コーティングは、カテーテル（例えば、改変PTCAカテーテル）を用いて塗布され得る。物質は、好ましくは、1つまたは多数のバルーンおよび内腔を有する1つのカテーテルを用いて塗布される。カテーテルは、比較的小さな断面積であるべきである。蛍光透視鏡のガイダンスを用いて操作される長い薄い管状カテーテ

ルは、器官または血管領域の内部への接近を提供するために好ましい。物質はまた、1つまたは多数の内腔を有する長い可撓性の管状デバイスを介して適合性形態の物質を噴霧、押出し、またはそうでなければ内部に送達することにより、コーティングされるべき表面に塗布され得る。

所望の位置に物質を配置する工程の間、侵襲性外科技術または比較的非侵襲性の技術（例えば、腹腔鏡手順または経皮トランスルミナル（transluminal）手順）のいずれかにより、その位置に接近し得る。物質の形状を固定するプロセスは、最初の物質の特性に応じていくつかの方法によりなされ得る。例えば、その適合性状態において物質は、バルーンカテーテルのバルーン部分を用いて形成され得、その後、その条件は、物質を非適合性にするように調節される。好適な実施

態様において、ゲルを、物質に対する赤外線、可視、UV、または超音波放射線を用いる光重合により、処置部位で非適合性にする。必要に応じて、ポリマーは、局部的加熱または化学的方法により非適合性にされ得る。熱制御は、例えば、バルーンを介する、またはバルーン中への流体流動を用いて、あるいは部分的に有孔のバルーンを用いて提供され得、温度制御流体がバルーンを通り抜けて内腔へ入る。熱制御はまた、抵抗性発熱体と接触してカテーテル本体の長さに沿って延びるワイヤを介する電気抵抗加熱を用いて提供され得る。この型の発熱体は、DCまたはラジオ周波数（RF）の電流または外部RFあるいはマイクロ波放射線を使用し得る。温度制御を達成する他の方法もまた用いられ得、これは内部光ファイバー（むき出しまたはレンズ化（lensed）された）を用いる光誘導加熱を含む。

1つの実施態様において、適合性物質を組織表面と接触させる工程は、「成形」手順と考えられ得、ここで、適合性物質は、非適合性になる前に、体組織との接触を実質的に適合するように成形される。適合状態から非適合状態への物質の転移は、物質の相変化を含み得るが、このような相変化は必ずしも必要ではないことに注目する。例えば、特定の実施態様において、用語「適合性」および「非適合性」は、主として実際の相変化を受けることなく、粘性および流動性が顕著に変化する物質の相対的記載である。あるいは、その適合状態と非適合状態との間の物質の転移は、物質の実際の相変化の結果であり得、その結果、物質からのエネルギーの付加または除去のいずれかを生じる。

ポリマー物質は、種々の厚さ、長さ、および3次元幾何形状（例えば、点、星形、線状、円筒状、弧状、らせん状）で注文設計され、種々の最終幾何形状を達成し得る。さらに、このプロセスを用いて、単層または多層形状のいずれかで、物質を中空、空洞、または管状の生物学的構造体（天然または人工的のいずれかで形成された）の内部表面に塗布し得る。このプロセスは、適切であれば、組織内腔を完全に閉塞するためにも使用され得る。

ペービングコーティングは、孔を有するか、または有しないかのいずれかの連続層として適用され得る。ペービングコーティングが孔を有しないで適用される場合、それは「シール」と呼ばれ、組織表面上のバリア層として機能する。この



コーティングはまた、例えば、個々の細胞または多数の細胞をコーティングまたはカプセル化するために、細胞表面に塗布され得る。

#### マイクロパーティクルの投与

注射可能なマイクロパーティクルは、静脈内、筋肉内、または皮下あるいは所望の治療効果に適切な他の公知の方法（肺に対するエアロゾルまたは噴霧として、またはオリフィスを介した直接洗浄による方法を含む）で、患者に投与され得る。粒子は、使用前に凍結乾燥され得、次いでマイクログラム/ml $\sim$ 100mg/mlの範囲で水性懸濁液中に処方され得る。

ポリマーキャリア中の生物学的活性分子の所望の濃度は、薬物の吸収、不活性化、および排泄速度ならびにキャリアからの分子の送達速度に依存する。投薬値もまた、緩和されるべき状態の重篤度と共に変化することに注目すべきである。特定の被験体にとって、特定の投薬レジメンは、個々の必要、および組成物の投与を施行するかまたは監督する人物の専門的判断に従って期間にわたって調節されるべきであることがさらに理解されるべきである。

マイクロパーティクルは、粒子の放出速度、および所望の投薬量に依存して、一度に投与され得るか、または種々の時間間隔で投与されるべき多数の少量の用量に分割され得る。

静脈内、筋肉内、または局所適用、あるいは他の送達経路に使用される溶液または懸濁液は、必要とされるように、以下の成分のいずれかを含み得る：無菌希釈剤（例えば、注射用水、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒）；抗菌剤（例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン）；酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム）；キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸）；緩衝液（例えば、酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩）および張度の調整のための薬剤（例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース）。親調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、ディスポーザブルシリンジあるいは多回用量バイアルに封入され得る。静脈内投与される場合、好ましいキャリアは、生理食塩水またはリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）である。

カテーテルは、任意の公知の物質（鋼鉄のような金属、および熱可塑性ポリマーを含む）から作製され得る。閉塞バルーンは、コンプライアントな物質（例えば、ラテックスまたはシリコーン）、またはコンプライアントでない物質（例えば、ポリエチレンテレフタレート（PET））から作製され得る。膨張可能な部材は、好ましくはコンプライアントでない物質（例えば、PET、（PVC）、ポリエチレンまたはナイロン）から作製される。使用する場合、バルーンカテーテルの膨張部分は、ポリマーコーティングの分離を助けるために、必要に応じてシリコーン、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）のような物質、水和ヒドロゲルのような親水性物質および他の潤滑物質でコーティングされ得る。

血管に加えて、このプロセスは、他の適用（例えば、静脈、輸尿管、尿道、気管支、胆管系および膵管系、腸、鼻涙管、洞腔（sinus cavity）、目、および欧氏管、精液管（spermatic tube）ならびに卵管の内部のコーティング）に使用され得る。同様に、このプロセスが用いられ、経肝（transhepatic）門脈体静脈シャント、透析移植片、動静脈フィステル、および大動脈瘤および他の動脈瘤の状況においてペービング層を提供し得る。このプロセスのペービングおよびシーリング物質はまた、冠状動脈のレベルでさえ他の直接臨床適用に使用され得る。これらは、以下を包含するが、これらに限定されない：PCTA後の突然の血管再閉鎖の処置、顕著な血管切開の「パッチング（patching）」、カテーテル損傷に対して2次的であるかまたは自発的に起こるいずれかの血管壁「弁」のシーリング、または種々の動脈炎（arteritidy）に関連する動脈瘤冠状拡張のシーリング。さらに、この方法は、冠状動脈バイパス移植の間の血管吻合のシーリングのような手術中の使用、および「包帯をした（bandaged）」滑らかなポリマー表面を提供する能力を提供する。

#### 特定の障害の処置

##### 血管新生

老化における一般的な問題は、下肢の動脈に影響をおよぼすアテローム性動脈硬化症である。これは、跛行、または歩行時の鋭い痛みを引き起こし得る。この疾患は、増殖因子（例えば、VEGF（血管内皮増殖因子）、またはVEGFを発現し得

るDNA)を導入することにより疾患領域(この場合、脚)にさらなる側副循環の作製を誘導することにより処置され得る。増殖因子またはDNAは、この因子を含む薄いコーティングをこの領域に達する動脈の内部に作製するか、またはこの因子を含むマイクロパーティクルを疾患四肢または領域に供給する動脈内に注入することのいずれかにより送達され得る。後者の場合、マイクロパーティクルは、送達粒子を領域中に優先的に局在化させるために、好ましくは少なくとも直径15ミクロン、好ましくは20ミクロン以上である。(いくつかのマイクロパーティクルは、おそらく処置領域、および肺またはどこかのロッジ(lodge)を出ることに注目すべきである；この効果は、処置計画において考慮されなければならない。)

別の適用としては、心組織(心筋層を含む)における血管再生、および発作または虚血後の血管再生が挙げられる。

#### 組織の再生または修復

さらに別の適用は、特定の器官の再生または修復においてである。種々の骨形態発生タンパク質の送達は、制御された骨の再造形、あるいはデノボの骨または軟骨形成に有用であり得、ここで、発生または形態発生効果は、厳密に標的部位に制限され、そして生体の至る所で示されないことが重要である。生物学的活性分子の局所沈着は、鼻道(nasal passage)および鼻洞(nasal sinus)のような領域における骨の修復に有用であり得、ここで、位置決めの正確な制御が必要とされる。

この方法で処置され得る他の組織の例としては、胃および腸が挙げられ、ここで、増殖因子は、潰瘍形成の修復、皮膚の外部潰瘍形成の修復、および一般的な

創傷修復の促進を助ける。

処置に対して感受性の他の器官系としては、物質が供給源から器官を通して流動し、その結果、因子が、コーティング中または粒子としてのいずれかで、流動により処置されるべき器官への点滴注入のために、投与され得る任意の器官系が挙げられる。例示的な器官としては、リンパ節、胆管、尿路、肺、脳脊髄液により占有される空間などが挙げられる。

本発明は、以下の非限定的な実施例を参照してさらに理解される。

#### 実施例1： インビトロでのゲルからの遺伝子送達

遺伝子の動脈への伝達に関する以前の研究は、液体ビヒクル中のDNAの投与に関係し、バルーンカテーテルを用いて液体を動脈壁の中にプレスする工程を包含する。より有効な局所送達のために、薄い局所的に沈着したゲル（ここからDNAが標的組織に拡散し得る）を用いた。

#### トランスフェクション手順

カチオン性脂質アナログ（1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン (DOTAP)）（別の命名法：N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N,トリメチル-アンモニウムメチルスルフェート）を含む正に荷電したリポソーム（トランスフェクション試薬、Boehringer Mannheim）を、トランスフェクションのために用いた。プラスミドDNAを、塩化セシウム勾配を介する遠心分離により精製した。5  $\mu$ gのDNAを、200  $\mu$ Lのハンクスの平衡塩類溶液（HBSS、Gibco）中の30  $\mu$ gのリポソームと混合した。

#### 発現ベクターおよび組換え遺伝子発現の分析

使用したルシフェラーゼ発現ベクターは、pRSV-LUC (Dr. A. Brasier, Galveston, TXの、Dr. Jeffrey M. Isner, St. Elizabeth's Hospital, Boston, MA（ベクターを提供した）への寄贈）であった。これは、ラウス肉腫ウイルス長末端反復プロモーターの制御下での転写を伴うホタルルシフェラーゼcDNAの5'欠失を含む。このレポーター遺伝子の使用により、細胞溶解物中の遺伝子発現の定量化が可能となる。細胞を、カルシウムを含まないHBSSで3回洗浄し、そして抽出液を1% Triton-X100™を含む細胞溶解剤（Promega, Madison WI）を用いて調製した。この抽出液の半分を、総タンパク質含有量の分析のためにとり、Biorad Micro

assay手順を用いて実施した。ウシ血清アルブミン（1 mg/ml）を、抽出液のもう半分にキャリアタンパク質として添加し、そしてルシフェラーゼ活性を測定した。このために、20  $\mu$ Lのアリコートを、室温にて甲虫ルシフェリンを含む100  $\mu$ Lのルシフェラーゼアッセイ試薬（Promega）と混合した。10秒間積分した光の発光

を、ルミノメーター (Turner Designs, Model 20e, Sunnyvale CA) を用いて測定した。光単位 (light unit) として読み取った結果は、既知量のルシフェラーゼ (Sigma, Product No. L-9009) の一連の希釈物を用いて評価される検出システムの直線範囲内であった。リン酸緩衝化生理食塩水または非トランスフェクト細胞の溶解物を用いて測定したバックグラウンド活性は、首尾一貫して0であった。

BostonのSt. Elizabeth's hospitalのDr. Jeffrey Isnerの研究室から得たプラスミドpRSVLUC (これは、SV40プロモーターの制御下で酵素ルシフェラーゼをコードする) を、ゲル化したプレポリマーに溶解した。プレポリマーは、HubbellらによるPCT US93/17669 (本明細書中で参考として援用される) の教示に従って合成した、各末端に約5個の乳酸残基 (各末端でアクリレート基によりキャップされた) を有する、ポリエチレングリコール (MW8000) のコアを有していた。ポリマー濃度は10%であった。適用方法は、他の点ではHill-Westら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5967-5971、1994に記載の方法と本質的に同一であった。組織表面を、1 mMのEosin Yの塗付により染色し、そして洗浄した。DNA、ならびに100mMエタノールアミンおよび0.15% n-ビニルピロリドンを含むポリマー溶液を、本質的にHill-Westにおけるように重合した。送達ビヒクル中のプラスミドの量は、 $0.02\mu\text{g}$ と $2\mu\text{g}$ との間であった。上記のリポソームを、必要に応じて含んだ。ウサギ動脈細片の管腔表面 (これを、本質的にTakeshitaら、J. Clin. Invest., 93:652-661(1994)により記載されるように、組織培養物中に維持した) を、HubbellらによるPCT US93/01776に従って光開始色素 (Eosin Y) で染色し、そして培地中で洗浄した。DNAを含み、添加リポソーム (DNA 1部あたりリポソームの重量で4部の比で) を含むか含まないプレポリマー溶液 (生理食塩水中の23%wtプレポリマー溶液) を、染色した動脈細片にスポットとして塗付した。溶液を緑色光を用いて光重合し、ヒドロゲルを形成した。コントロールとして、動脈細片を、DNA/プレポリマー溶液で処理した。これは光照射によりゲル化しなかった。培養物中で7日後、ルシフェラーゼ発現を、標準方法により、組織1グラムあたりのTurner Light Unit (TLU/g) で測定した。

DNA塗布（2マイクログラム/用量）の最適レベルで、コントロールは $3.3 \pm 3.3$  TLU/gを有していた；リポソーム内にカプセル化されていないDNAを含むゲルで処理した組織は、 $10.7 \pm 3.6$  TLU/gを有していた；そしてリポソーム内にカプセル化されたDNAを含むゲルで処理した組織は、 $20.8 \pm 1.7$  TLU/gを有していた。

この結果は、遺伝子伝達および発現が、リポソームを含むかまたは含まないゲルを用いる送達により達成され得、そして送達の有効性が、DNAを単に組織表面に塗布する場合よりも顕著に高いことを示す。しかし、この結果はまた、伝達の実効性が、固定化前にDNAをリポソームに取り込むことにより非常に増加され得ることを示す。

実施例2： 光重合性ヒドロゲルを介するインビボでのルシフェラーゼ遺伝子送達

インビボ遺伝子送達を、ラット頸動脈モデルを用いて証明した。実施例1に記載のように調製した、界面重合したゲルを、ラットの右頸動脈中に形成した。左側は処置せず、コントロールとして用いた。ゲルは、プレポリマー溶液（10% w/vプレポリマーを含む）1 mlあたり25マイクログラムのDNAを含み、プレポリマー1 mlあたり100マイクログラムのリポソーム中にカプセル化された。そしてそれ以外はHill-Westらにより記載のように沈着させた。動脈に緑色光を照射してマクロマーを重合させ、厚さ約100マイクロメートルの層が生じた。3日後、ラットを屠殺し、そして組織をルシフェラーゼ発現について試験した。

コントロール（非処置）動脈においては遺伝子発現は明らかではなかったが、処置動脈は $8.2 \pm 6.2$  TLU/gを有していた。

さらなるコントロールとして、DNA/マクロマー溶液を、動脈血管外膜（外側）表面に塗布し、そして生理食塩水で洗い流した；または内部表面に塗布し、照射しなかった。前者の処置は、 $0.85 \pm 0.21$  TLU/gを与え、そして後者は $3.9 \pm 3.7$  TLU/gを与えた。

本発明の前述の詳細な説明から、特許請求されている発明の変形および改変は

当業者には明らかである。これらの変形および改変はすべて、添付の請求の範囲

の範囲内に包含される。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K9/127 A61K9/00		International Application No. PL/US 95/14103
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO.A.85 03640 (THE LIPOSOME COMPANY, INC.) 29 August 1985	1,2,4-8. 10-13
Y	see the whole document ---	1-7
X,P	WO.A.95 22316 (MARX) 24 August 1995 see the whole document ---	1,4-12
Y	WO.A.93 00051 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 7 January 1993 see the whole document ---	1-7
A	WO.A.92 05866 (BOARD OF THE REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 16 April 1992 see the whole document -----	3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  21 February 1996		Date of mailing of the international search report  - 1. 03. 96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentism 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Benz, K



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 95/14103

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Remark: Although claims 1-9 are directed to a method of treatment of the human/animal body the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No.

PCT/US 95/14103

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8503640	29-08-85	US-A- 4708861	24-11-87
		CA-A- 1245156	22-11-88
		DE-A- 3583779	19-09-91
		EP-A, B 0172907	05-03-86
		IE-B- 58975	15-12-93
		JP-T- 61501686	14-08-86
-----			
WO-A-9522316	24-08-95	NONE	
-----			
WO-A-9300051	07-01-93	US-A- 5328470	12-07-94
		CA-A- 2112375	07-01-93
		CA-A- 2112376	07-01-93
		EP-A- 0591385	13-04-94
		EP-A- 0591408	13-04-94
		JP-T- 6509328	20-10-94
		JP-T- 6509329	20-10-94
		WO-A- 9300052	07-01-93
-----			
WO-A-9205866	16-04-92	US-A- 5238714	24-08-93
		AU-B- 659622	25-05-95
		AU-B- 9076691	28-04-92
		CA-A- 2092551	03-04-92
		EP-A- 0553299	04-08-93
		JP-T- 6504716	02-06-94
		US-A- 5484584	16-01-96
-----			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**